

CITATION 2

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-503307

⑬ 公表 平成4年(1992)6月18日

⑭ Int.Cl.
C 12 P 21/08
A 61 K 39/395

識別記号 ZNA
厅内整理番号 8214-4B
8413-4C
ADU T 8413-4C※

審査請求 未請求
予備審査請求 有 部門(区分) 1 (1)

(全 12 頁)

⑮ 発明の名称 ヒト腫瘍に関連する新規抗原に対する新規モノクローナル抗体

⑯ 特願 平2-503697

⑭ 翻訳文提出日 平3(1991)8月7日

⑯ 出願 平2(1990)1月23日

⑭ 国際出願 PCT/US90/00407

⑭ 国際公開番号 WO90/09197

⑭ 国際公開日 平2(1990)8月23日

優先権主張 ⑮ 1989年2月17日⑯ 米国(U S)⑭ 312,640

⑰ 発明者 ヘルストロム カルル エリック アメリカ合衆国 ワシントン州 98105 シアトル ノースイース

ク ト サーバー ドライブ 3925

⑱ 出願人 オンコーゲン アメリカ合衆国 ワシントン州 98121 シアトル ファースト

アベニュー 3005

⑲ 代理人 弁理士 中村 紘 外7名

⑳ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F I, F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許)

最終頁に統く

請求の範囲

- ヒト腫瘍細胞の細胞表面糖タンパク質抗原上の決定基部位に結合する、ハイブリドーマ細胞系 A T C C No. H B 9 8 0 4 により生成されたモノクローナル抗体、並びに前記抗体の機能的等価物、結合フラグメント及び免疫複合体。
 - 腫瘍細胞が癌細胞である、請求項1に記載のモノクローナル抗体。
 - 癌細胞が肺、卵巣、結腸及び胸部癌細胞からなる群から選ばれる、請求項2に記載のモノクローナル抗体。
 - 腫瘍細胞が黑色腫細胞である、請求項1に記載のモノクローナル抗体。
 - 腫瘍細胞が肉腫細胞である、請求項1に記載のモノクローナル抗体。
 - 検出可能シグナルを生ずることができる標識に接合された請求項1に記載のモノクローナル抗体。
 - 標識が放射性同位体、酵素、蛍光物質及び発色团からなる群から選ばれる、請求項6に記載のモノクローナル抗体。
 - ヒト腫瘍細胞の細胞表面糖タンパク質抗原であって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定されて約100,000ダルトンの分子量により確認され、次の：
- | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P | | | | | |
- (式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)
- のようなアミノ末端アミノ酸配列を有する抗原上の決定基部位に結合する、ハイブリドーマ細胞系 A T C C No. H B 9 8 0 4 により生成されたモノクローナル抗体、並びに前記抗体の機能的等価物、結合フラグメント及び免疫複合体。

9. 請求項8に記載の抗体の治療的に有効な量を薬学的に許容できる非経口試形剤に関連して含む、腫瘍治療用組成物。

10. 骨髓腫細胞と、ヒト腫瘍細胞の細胞表面糖タンパク質抗原であって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定されて約100,000ダルトンの分子量を有し、次の：

1	5	10	15	20	25
W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P					

(式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)

のようなアミノ末端アミノ酸配列を有する抗原上の決定基部位に結合する抗体を生ずることができる細胞との融合により形成されたハイブリドーマ細胞系により生成されるモノクローナル抗体、並びに前記抗体の機能的等価物、結合フラグメント及び免疫複合体。

11. クラスI g Gである、請求項10に記載のモノクローナル抗体。

12. サブクラスI g G 2 aである、請求項10に記載のモノクローナル抗体。

13. マウス抗体である、請求項10に記載のモノクローナル抗体。

14. ヒト腫瘍細胞に関連する細胞表面糖タンパク質抗原であって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定されて約100,000ダルトンの分子量により確認され、次の：

1	5	10	15	20	25
---	---	----	----	----	----

W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P					
---	--	--	--	--	--

(式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)

のようなアミノ末端アミノ酸配列を有する抗原上の決定基部位と反応性のモノクローナル抗体、並びに前記抗体の機能的等価物、結合フラグメント及び免疫複合体。

特表平4-503307(2)

15. ハイブリドーマ細胞系ATCC No. HB 9804により生成されるモノクローナル抗体からなる、請求項14に記載のモノクローナル抗体。
16. ヒト抗体である、請求項14に記載のモノクローナル抗体。
17. マウスヒト抗体である、請求項14に記載のモノクローナル抗体。
18. 請求項14に記載の抗体の治療的に有効な量を薬学的に許容できる非経口試形剤に開示して含む、腫瘍治療用組成物。
19. ヒト腫瘍の検出のための：
- a) ヒト腫瘍細胞に関連する細胞表面糖タンパク質抗原であって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定されて約100,000ダルトンの分子量により確認され、次の：
- | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P | | | | | |
- (式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)
- のようなアミノ末端アミノ酸配列を有する抗原と反応性の、検出できるように標識されたモノクローナル抗体を腫瘍細胞の試料と組合わせること、及び
- b) 前記抗原に関連する腫瘍細胞に結合する前記標識モノクローナル抗体を検定すること、
- を含む免疫検定法。
20. モノクローナル抗体がハイブリドーマ細胞系ATCC No. HB 9804により生成される抗体である、請求項19に記載の免疫検定法。
21. 抗体が放射性核種、酵素、蛍光物質及び発色団からなる群から選ばれる標識で標識される、請求項19に記載の免疫検定法。
22. 請求項1、8、10又は14に記載のモノクローナル抗体を医薬に接合させること；及び
- c) 前記接合したモノクローナル抗体を適当な担体中でヒト腫瘍患者に投与すること、
- を含む免疫療法の方法。
32. モノクローナル抗体が抗イディオタイプ抗体である、請求項31に記載の方法。
32. 癌細胞又はその免疫原決定基で免疫処置したマウスから得られるリンパ球とマウス骨髓腫細胞とのハイブリドーマを含む、ヒト癌細胞の細胞表面糖タンパク質抗原上の決定基部位に結合する能力を特徴とするモノクローナル抗体を生成する連続細胞系。
34. 癌をもつヒトから得られるリンパ球と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを含む、ヒト癌細胞の細胞表面糖タンパク質抗原上の決定基部位に結合する能力を特徴とするモノクローナル抗体を生成する連続細胞系。
35. ヒト腫瘍細胞の細胞表面糖タンパク質抗原上の決定基に結合できるハイブリドーマ細胞系ATCC No. HB 9804モノクローナル抗体。
36. NS1マウス骨髓腫細胞と、肺腺癌CH3細胞で免疫処置したBALB/cマウスから得られたマウス脾細胞とを融合することにより形成され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定して約100,000ダルトンの分子量を有し、次の：
- | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P | | | | | |
- (式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)
- のようなアミノ末端アミノ酸配列を有する腫瘍細胞の細胞表面糖タンパク質抗原の決定基に結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞系ATCC No. HB 9804。
23. 腫瘍細胞が肺癌細胞であり、ヒト組織が肺組織である、請求項22に記載の方法。
24. 腫瘍細胞が乳癌細胞であり、ヒト組織が胸部組織である、請求項22に記載の方法。
25. 腫瘍細胞が結腸癌細胞であり、ヒト組織が結腸組織である、請求項22に記載の方法。
26. 腫瘍細胞が卵巣癌細胞であり、ヒト組織が卵巣組織である、請求項22に記載の方法。
27. 腫瘍細胞が黒色腫細胞である、請求項22に記載の方法。
28. 腫瘍細胞が内臓細胞である、請求項22に記載の方法。
29. モノクローナル抗体と腫瘍細胞との相互作用が免疫組織学的染色により検出される、請求項22に記載の方法。
30. 生体内ヒト腫瘍を、
- a) 請求項1、8、10又は14に記載のモノクローナル抗体を精製すること；
- b) 前記抗体を放射能標識すること；
- c) 前記抗体を適当な担体中でヒト患者に投与すること、及び
- d) 外部シチグラフィー、発光断層撮影法又は放射性核スキャンによりモノクローナル抗体の位置決定すること、
- を含む位置決定する方法。
31. 腫瘍の治療のための、
- a) 請求項1、8、10又は14に記載のモノクローナル抗体を精製すること；
- b) 前記モノクローナル抗体を細胞毒性物質、毒素又は放射性

37. 腫瘍細胞に関連する細胞表面糖タンパク質抗原であって約100,000ダルトンの分子量を有し次の：
- | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P | | | | | |
- (式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)
- のようなアミノ末端アミノ酸配列を有する抗原上の決定基部位に結合する能力を特徴とするモノクローナル抗体を生成する、前記抗原に対する抗体を生成できるリンパ球と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを含む連続細胞系。
38. 実質的に純粋な形態の糖タンパク質抗原であって、ヒト腫瘍細胞から得られ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定して約100,000ダルトンの分子量を有し、次の：
- | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P | | | | | |
- (式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)
- のようなアミノ末端アミノ酸配列を有する抗原、及びこの抗原の免疫複合体。
39. 請求項35に記載の抗原をコードするDNAを含む組換えウイルスを含む、腫瘍に対する免疫処置に用いるワクチン。
40. ウイルスがワクシニアウイルスである、請求項38に記載のワクチン。
41. 請求項39に記載のワクチンの治療的に有効な量を投与することを含む、腫瘍に対する免疫処置法。

特表平4-503307(3)

明細書

ヒト腫瘍に関連する新規抗原に対する新規モノクローナル抗体発明の分野

本発明は新規モノクローナル抗体及び新規抗原、並びにヒト癌細胞と反応性の前記新規モノクローナル抗体を製造及び使用する方法に関するものである。より詳しくは本発明のモノクローナル抗体は胸部、結腸、卵巣及び肺の癌並びに黒色腫及び肉腫を含む種々のヒト腫瘍に関連する新規細胞表面抗原と反応性である。

本発明のモノクローナル抗体は生体内及び試験管内双方の臨床診断的例えば悪性癌の検出に適する。さらに、本発明の抗体は治療的使用に、例えば腫瘍細胞との反応に、並びに接合体において化学療法薬、毒素、免疫学的応答修飾因子及び放射性同位体を含み、しかしそれらに限定されない抗腫瘍効果を有する種々の物質の標的選択性抗体として適する。本発明の抗原もまた治療及び診断のために有用である。

発明の背景

癌は毎年数百万人の死亡の原因である。例えば、肺癌は男性間の癌をもとにする死亡の大部分の原因であり、女性の間の癌死の最もよくある原因としての乳癌を追い越しつゝある。多くの場合の癌は疾患の初期段階において根本的に除去されないと化学療法及び放射線療法により治癒されない。従って、胸部、結腸、卵巣及び肺の癌、並びに他の悪性新生物例えば黒色腫及び肉腫に対する診断及び治療の方法に対しより大きい要求が存在する。

癌関連抗原と反応性のモノクローナル抗体が知られている〔例えばパプシテロ (Papsidero)、Semin. Surg. Oncol., 1 (4) : 171~81 (1985); シュロム (Schlom) ほか、Important Adv. Oncol., 170~92 (1985); アラム (Allum) ほか、

Surg. Ann., 18 : 41~64 (1986); ホートン (Houghton) ほか、Semin. Oncol., 13 (2) : 165~79 (1986); 「癌におけるモノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies In Cancer)」、「診断及び治療の進歩 (Advances for Diagnosis and Treatment)」、ロス (Roth) 編、フーツラ・パブリッシング (Future Publishing, Mt. Kisco, New York) (1986); 及び「モノクローナル抗体を用いる試験管内診断 (Cancer Diagnosis In Vitro Using Monoclonal Antibodies)」、クプチク (Kupchik) 編、マーセル・デッカー (Marcel Dekker, Inc., New York) (1988) 参照〕。

既知モノクローナル抗体の大部分は若干の型のヒト癌と反応性であるが、少数の抗体は身体の特定器官例えば肺、胸部、卵巣、結腸、胃又は脾臍由来する癌と反応する。標的抗原は通常糖タンパク質又は糖脂質である〔ヘルストロム (Hellstrom) ほか、Cancer Research, 48 : 3817~23 (1986); 及びフィンク (Fink) ほか、Prog. Clin. Pathol., 8 : 121~33 (1984) 参照〕。例えば、特定型の癌細胞上の糖タンパク質抗原と反応性のモノクローナル抗体には米国特許第4,737,579号(非小細胞肺癌に対するモノクローナル抗体)、米国特許第4,753,884号(ヒト乳癌に対するモノクローナル抗体)、米国特許第4,579,827号(ヒト胃腸癌に対するモノクローナル抗体)、及び米国特許第4,713,352号(ヒト腎臓癌に対するモノクローナル抗体)が含まれる。若干のモノクローナル抗体はムチンであると思われる高分子量抗原と反応する。例えばモノクローナル抗体B72.3は多くの異なる癌上に選択的に発現される1,000 kDa以上の分子量の腫瘍関連胎児癌抗原を認識すると思われる。例えば、B72.3は乳癌の84%、結腸癌の94%、

卵巣癌の100%及び非小細胞肺癌の96%と反応することが示された〔ジョンストン (Johnston)、Acta Cytol., 1 (5) : 537~56 (1987) 及びシュロム (Schlom) ほかに対し発行された米国特許第4,812,282号参照〕。同様に、モノクローナル抗体KC-4は多くの癌例えば結腸、前立腺、肺及び乳癌上に発現された約400~500 kDaタンパク質抗原を認識する(米国特許第4,708,930号参照)。

一定の腫瘍細胞に関連すると思われる糖脂質抗原と反応性のモノクローナル抗体もまた開示された。例えば、ヤング (Young) ほか、J. Exp. Med., 150 : 1008~19 (1979) はアシアロGM₁、キルステン (Kirsten) マウス肉腫ウイルスにより形成転化されたBALB/c 3T3細胞に対するマーカーとして決定された細胞表面グリコスフィンゴリビド抗原、に特異的な2つのモノクローナル抗体の生成を開示している。またニーブ (Kniep) ほか、J. Immunol., 131 (3) : 1591~94 (1983) 及び米国特許第4,507,391号(ヒト黒色腫に対するモノクローナル抗体) 参照。

さらに、特定型の癌細胞上に認められた糖脂質抗原と反応性のモノクローナル抗体には、ローゼン (Rosen) ほか、Cancer Research, 44 : 2052~61 (1984) (ヒト小細胞肺癌に対するモノクローナル抗体)、バルキ (Varki) ほか、Cancer Research, 44 : 681~87 (1984) (肺、胃及び結腸のヒト腺癌並びに黒色腫に対するモノクローナル抗体)、及び米国特許第4,579,827号(ヒト結腸肺癌に対するモノクローナル抗体)により開示されたものが含まれる。また、ヒト非小細胞肺癌、乳癌及び結腸癌の表面上に発現された炭水化物抗原を認識するL6モノクローナル抗体を記載するヘルストロム (Hellstrom) ほか、

Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 83 : 7059~63 (1986) 参照。

種々の腫瘍細胞上に認められる抗原に対する反応性を示す他のモノクローナル抗体が非常に要求されている。これは診断及び治療において、同じ腫瘍塊に向かう異なるモノクローナル抗体の組合せの使用をしばしば必要にする多くの腫瘍の抗原異質性のためである。さらに、広範囲の腫瘍と高度の反応性を示し、一方、正常組織と反応性がないか又は単に非常に弱い反応性を示すモノクローナル抗体は一般的でない。そのような抗体は明らかに有益であろう。

従って、種々の腫瘍により高レベルで発現される抗原と反応性のモノクローナル抗体が癌の早期診断、癌の広がりの良好な観察、患者の免疫学的モニター、並びに癌の治療のための改良法の開発に対し有用になることができる事が明らかである。新規細胞表面分子に対するモノクローナル抗体を、癌ワクチンの形態における免疫原の開拓に有用であることができ、また例えばホルモン又は成長因子のレセプターとしてあるいは細胞内及び細胞間伝播中に含まれる他の分子として重要な細胞機能を有することができる分子をさらに限定するために使用できる。抗原は独自で酵素又は成長因子活性を有することさえできる。

発明の概要

本発明は肺、胸部、卵巣及び結腸癌並びに黒色腫及び肉腫細胞を含む種々のヒト腫瘍細胞に関連する細胞表面糖タンパク質抗原、L45抗原、Lの決定基部位に対し特異的であるモノクローナル抗体、L45、を提供する。例えば、本発明の抗体は抗体L45により確認されるL45抗原を発現する腫瘍の診断及び治療に有用であることができる。本発明のL45抗体はクラスIgG、

特表平4-503307(4)

IgG2aサブクラスであり、正常ヒト細胞と有意な反応性を示さない。

本発明の抗体はヒト肺臓組織及び他のヒト組織中の悪性状態の存在を測定する試験管内診断法に使用できる。該方法は抗体L45と反応性の100,000ダルトンL45抗原結合タンパク質の特性を有する抗原の存在に対する組織の試験を含む。例えば、L45抗原の特性を有する細胞間連抗原の決定基部位を限定する本発明のL45モノクローナル抗体、この抗体の官能性等価物又はフラグメントに組織を接触させ、前記抗体と抗原決定基との相互作用を検出することができる。そのような方法の1つは癌細胞を含む疑いのある試料中のそのような細胞の存在の決定を含む。試料は、そのような細胞を試料中に存在できる他の細胞型から区別できるモノクローナル抗体に接触させる。接触はそのような細胞に抗体が結合する条件のもとで行なわれる。接触後、試料中の細胞に対する抗体の結合の存在又は存在しないことが決定される。この結合は試料中の癌細胞の存在又は存在しないことに関連する。一般に、試料はモノクローナル抗体の標識された特異結合パートナーに接触させる。この標識は検出可能なシグナルを生ずることができる。あるいはモノクローナル抗体自身を標識することができる。

他の診断法は検出可能なシグナルを与える物質で標識された本発明の精製抗体又は抗体フラグメントを患者に投与することによる腫瘍の生体内位置決定を含む。位置決定は次いで外部シンチグラフィー、発光断層撮影法又は放射性核スキャンを用いて検出される。この方法はまた疾患の程度に関する癌患者の段階化及び治療に応答した変化をモニターする一層良い方法を与えることができる。

本発明はまた、L45抗体及び類似の抗体が腫瘍細胞表面に高

濃度に発現されるL45抗原と反応できるので、治療用途を有する。本発明のモノクローナル抗体は腫瘍の治療用組成物の製造に使用できる。その組成物は治療的に有効な量の抗体を薬学的に許容できる非経口試形剤に関連して含む。本発明の抗体はまた、化学療法薬、毒素、免疫学的応答修飾因子及び放射性同位体を含み、しかしそれらに限定されない腫瘍効果を有する種々の物質の組合として免疫接合体中に使用できる。

本発明はまた、約100,000ダルトンの分子量により確認され、アミノ末端アミノ酸配列：

S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-P

(式中、Xは未確認アミノ酸を表わす)を有する新規L45抗原、並びに抗体L45及びこの抗原に結合するクラスの抗体により確認される等価物を含む。

本発明は精製又はクローン化したL45抗原をワクチンとして一定の腫瘍に対する免疫処置に使用する方法を含む。

発明の詳細な説明

記載した発明をより完全に理解するために、次の詳細な説明が示される。

本発明は、肺、結腸、胸部、卵巣の癌、並びに黑色腫及び肉腫細胞を含むヒト腫瘍細胞上に局在する抗原(L45抗原)と特異的に反応性である、L45と称される新規モノクローナル抗体、L45モノクローナル抗体を製造する方法、並びに該抗体を用いる診断及び治療法に関するものである。L45抗体は一連の腫瘍と反応するが、正常ヒト組織又は他の型の腫瘍例えばリンパ腫と実質的に反応性を示さない。

本発明はさらに、肺、胸部、結腸、卵巣のヒト腫瘍、並びに黑色腫及び肉腫に関連するL45抗原と称する新規細胞表面糖タン

パク質抗原並びにL45抗原を使用する方法に関する。

本発明のモノクローナル抗体はハイブリドーマ融合法により又はEBV-不死化法を用いる方法により製造できる。

ハイブリドーマ融合法は最初にコーラーほか(Kohler and Milstein)により導入された(コーラーほか(Kohler and Milstein)、Nature, 256: 495~97(1975); ブラウン(Brown)ほか、J. Immunol., 127(3): 539~46(1981); ブラウン(Brown)ほか、J. Biol. Chem., 255: 4880~83(1980); イー(Yeh)ほか、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA), 78(6): 2927~31(1976); 及びイー(Yeh)ほか、Int. J. Cancer, 29: 269~75(1982)参照)。

これらの方法は動物(例えばマウス)中へ免疫原(例えば精製抗原あるいは抗原をもつ細胞又は細胞抽出物)を注入してその動物中の所望免疫応答(すなわち抗体の生成)を誘発させることを含む。例えば胸水からのヒト肺癌細胞、外植ヒト非小細胞癌(NSCLC)からの培養細胞、又は正常胎児肺臓からの細胞、あるいはそのような細胞からの溶解物を免疫原として使用できる。例示例において、NSCLC(ヒト肺腺癌)、系統CH3、からの外植細胞を免疫原として使用した。細胞は例えばマウス中へ注入し、十分な時間後にマウスを殺し、体性抗体産生リンパ球を得る。抗体産生細胞は感作動物のリンパ節、脾臓及び末梢血から得ることができる。脾細胞が好みしい。マウスリンパ球は後記マウス骨髓腫で高率の安定融合を与える。ラット、ウサギ及びカエル体細胞の使用もまた可能である。所望免疫グロブリンをエンコードする脾細胞染色体は、脾細胞を骨髓腫細胞と、一般に融合剤例えばポリエチレンジリコール(PEG)の存在下に融合させる

ことにより不死化される。多くの骨髓腫細胞系、例えばP3-N-S1/1-Ag4-1、P3-x-B3-Ag8.853又はSp2/0-Ag14骨髓腫系、のいずれも標準法による融合パートナーとして使用できる。これらの骨髓腫系はアメリカン・タイプ・カルチャーリ・コレクション(ATCC, Rockville, Maryland)から入手できる。

得られた所望ハイブリドーマを含む細胞は次いで、非融合親骨髓腫又はリンパ球細胞が実質的に死ぬ選択性培地例えばHAT培地中で増殖される。ハイブリドーマ細胞のみが生存し、限界希釈条件のもとで増殖されて分離したクローンを得ることができる。ハイブリドーマの上澄みを所望特異性の抗体の存在について、例えば免疫処置に用いた抗原を用いて免疫検定法によりスクリーニングする。次いで陽性クローンを限定希釈条件のもとでサブクローン化することができ、生じたモノクローナル抗体を分離することができる。種々の普通の方法がモノクローナル抗体の分離及び精製に対して存在し、それから他のタンパク質及び不純物が除かれる。モノクローナル抗体の精製に普通に使用される方法には硫酸アンモニウム沈降法、イオン交換クロマトグラフィー及びアフィニティーコロマトグラフィーが含まれる(例えばゾラ(Zola)ほか、「モノクローナルハイブリドーマ抗体: 方法及び適用(Monoclonal Hybridoma Antibiotics: Techniques and Applications)」、ヒュレル(Hurell)編、pp51~52(CRC・プレス、1982)参照)。これらの方法により製造されたハイブリドーマは試験管内又は生体内(腹水中)で、該技術において知られた方法を用いて増殖させることができる(一般に、フィンク(Fink)ほか、前掲、123頁、図6-1参照)。

一般に、個々の細胞系は試験管内で、例えば実験室培養容器中

特表平4-503307(5)

で増殖でき、高濃度の单一特異性モノクローナル抗体を含む培地をデガンテーション、滅菌又は遠心分離により収集することができる。あるいは、モノクローナル抗体の収量は、初めの場合に体性及び骨髓腫細胞を与えるために用いた型の組織適合性動物中へハイブリドーマの試料を注入することより高めることができる。融合細胞ハイブリッドにより生成される特異モノクローナル抗体を分泌する腫瘍が注入動物中に生ずる。動物の体液例えば腹水又は血清がモノクローナル抗体を高濃度で与える。コール(Cole)ほか、前掲、により論議されたように、ヒトハイブリドーマ又はEBV-ハイブリドーマを使用すると、動物例えればマウス中へ注入される異種移植片の拒絶反応を回避することが必要である。免疫不全又はヌードマウスを使用でき、あるいはハイブリドーマを初めに照射ヌードマウス中へ固体皮下腫瘍として継代し、試験管中で培養し、次いで多量の特異ヒトモノクローナル抗体を分泌する腹水腫瘍を生ずるブリストン感作、照射ヌードマウス中へ腹腔内注入することができる〔コール(Cole)ほか、前掲、参照〕。

一定の治療適用に対し、マウス抗体で治療した患者がヒト抗マウス抗体を生ずるので、キメラ(マウス-ヒト)又はヒトモノクローナル抗体がマウス抗体より好みである〔ショーラー(Shawler)ほか、J. Immunol., 135: 1530~35 (1985)〕。L45抗原と反応性のキメラマウス-ヒトモノクローナル抗体は、例えはキメラ抗体の製造のために最近開発された方法により製造することができる〔オイ(OI)ほか、Biotechnologies, 4(3): 214~221 (1986); リウ(Liu)ほか、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA), 84: 3439~43 (1987)〕。従って、マウスL45抗体分子の不变部領域をコードする遺伝子が、適当な生物学的活性(例えはヒト補体の活性化及びADCCを仲

介する能力)をもつ抗体の不变部領域をコードするヒト遺伝子で置換される。マウス又はヒト起源の新規抗体はまた適当な生物学的機能をもつしL45抗原に対して作ることができる。例えは、ヒトモノクローナル抗体は、抗原例えれば本発明のL45抗原を用い、ボレベック(Borrebeck)ほか[Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA), 85: 3995~99 (1988)]により記載されたように、試験管内でヒトリンパ球を抗原に感作させ、次いでEBV形質転換又は抗原感作リンパ球とヒトリンパ球とのハイブリドーマ形成することにより作ることができる。

好みの態様によれば、L45と称される本発明の抗体が、実施例中に記載するように、肺腺癌細胞系CH3を免疫原として用いてハイブリドーマ法により製造された。L45抗体を生ずるL45ハイブリドーマはATCC、Rockville, Marylandに寄託され、そこで次のように確認された:

L45 受託番号: HB9804

L45抗体は1gG2aサブクラスである。該抗体は種々の型の腫瘍細胞例えは胸部、肺、結腸及び卵巣の癌と、並びに悪性黒色腫及び肉腫と非常に強い反応性を示す。L45抗体は細胞リンパ腫細胞系、CEM、MOLT-4及びB細胞リンパ腫系P3HR-1に対し検出可能な結合を示さない。

さらに、本発明の抗体は、主要器官例えは腎臓、脾臍、肝臍、皮膚、肺臍、胸部、結腸、脳、甲状腺、心臓、リンパ節又は卵巣の肺芽細胞、内皮細胞又は上皮細胞のような正常なヒト組織に対し免疫組織学的に検出可能な結合を示さない。また該抗体は末梢白血球と反応しない。従ってこの抗体はその一連の腫瘍細胞に対する特異性及びその正常細胞に比べて腫瘍細胞に対する高度の特異性において多くの既知抗腫瘍抗体より優れている〔例えば

ヘルストロム(Hellstrom)ほか、「診断及び治療における共有結合的に修飾された抗原及び抗体(Covalently Modified Antigens And Antibodies In Diagnosis And Therapy)」、クアシュ(Quash)/ロドウェル(Rodwell)(編)、pp24~28、マルセル・デッカー(Marcell Dekker, Inc.)、(1989); 及びバグショウ(Bagshawe)、Br. J. Cancer, 48: 167~75 (1983) 参照〕。

本発明が前記L45抗体及び該抗体の活性結合領域を含むそのフラグメント例えはFab、P(ab'),及びF₁フラグメントを包含することを理解すべきである。そのようなフラグメントは該技術において十分確立された技術を用いてL45抗体から製造することができる〔例えは、ルソークス(Rousseaux)ほか、Methods Enzymol., 121: 663~69、アカデミック・プレス(Academic Press)、(1986) 参照〕。

さらに、本発明はL45と同じ抗原決定基に結合でき、その部位における結合に対してL45抗体と拮抗できる抗体を包含する。これにはL45抗体と同様の抗原特異性を有し、しかし種起原、イソタイプ、結合親和力又は生物学的機能(例えは細胞毒性)において異なる抗体を含む。例えは、本発明の抗体のクラス、イソタイプ及び他の変異体は該技術において知られた組換えクラース-スイッチ及び融合技術を用いて構築することができる〔例えは、サンマナ(Thammana)ほか、Bur. J. Immunol., 13: 614 (1983); スピラ(Spira)ほか、J. Immunol. Meth., 74: 307~15 (1984); ノイバーガー(Neuberger)ほか、Nature, 312: 604~08 (1984); 及びオイ(OI)ほか、前掲、参照〕。従って、L45抗体と同じ結合特異性を有するキメラ抗体又は他の組換え抗体(例えは、リンホカインのよう

な第2タンパク質に融合した抗体)は本発明の範囲内に属する。さらに、本発明の抗体が結合するL45抗原が新規汎腫瘍抗原であるので、本発明の抗体は、L45抗体が反応するもの以外の決定基を含め、L45抗原上の抗原決定基に結合する抗体を包含する。

本発明の範囲内にはまた本発明のL45抗体の抗イディオタイプ抗体が含まれる。これらの抗イディオタイプ抗体はL45抗体を免疫原として用いて製造することができ、腫瘍に対する体液性応答の検出において、及び患者内に抗腫瘍応答を誘発させる治療適用において、例えはワクチン中に、有用であることができる〔例えは、ネポム(Nepom)ほか、Cancer And Metastasis Reviews, 6: 487~501 (1987); 及びリー(Lee)ほか、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA), 82: 6286~90 (1985) 参照〕。

L45抗体は、それが結合するL45抗原の分離及び確認に使用できる。例えは、L45はプローブとして使用して抗体により認識されるエピトープの同定及び確認並びに癌細胞の表面上のL45抗原をさらに限定することができる〔例えは、ハコモリ(Hakomori)、Ann. Rev. Immunol., 2: 103~26 (1984); ブラウン(Brown)ほか、J. Immunol., 127: 539~546 (1981); ブラウン(Brown)ほか、Nature, 296: 171~173 (1982); 及びローズ(Rose)ほか、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA), 83: 1261~1265 (1986) 参照〕。

本発明のモノクローナル抗体により認識されるL45抗原は胸部、結腸、卵巣及び肺の癌、並びに黑色腫及び肉腫を含む腫瘍細胞の新規細胞表面糖タンパク質抗原を含む。L45抗原はポリアクリルアミドゲル電気泳動で免疫沈降されると約100,000ダルト

特表平4-503307(6)

ンの分子量を有する。

新規 L 45 種タンパク質抗原のアミノ末端アミノ酸配列は次のとおりである：

1	5	10	15	20	25
W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-H-P					

(式中、Xはまだ確認されなかったアミノ酸を表わし、残余の文字はアミノ酸に対する通常の一文字略号を表わす)。26残基し L 45 アミノ末端配列を現在のタンパク質データベース (PIR Release 1.6、1988年3月) 中に蓄積されたものと比較すると他の既知配列と有意な配列相同を示さない。

本発明のモノクローナル抗体はまた診断用途に、試験管内及び生体内の両方において、L 45 抗体が特異的に反応性である L 45 抗原をもつヒト腫瘍の検出に対して有用である。試験管内診断法は該技術においてよく知られ〔例えば、ロス (Roth)、前掲、及びクプシク (Kupchik)、前掲、参照〕、腫瘍細胞 (例えば、ヒト組織、細胞又は切除腫瘍試料上) の免疫組織学的検出、又は腫瘍関連抗原 (例えば、血液試料又は他の生物学的流体中) の血清学的検出が含まれる。

免疫組織学的方法は生物学的試料例えば腫瘍組織試料を本発明の抗体に接触させ、次いでその抗原に複合体化した抗体の試料上の存在を検出することを含む。試料によるそのような抗体-抗原複合体の形成は組織中の腫瘍細胞の存在を示す。試料上の抗体の検出は該技術において知られた方法例えば免疫ペルオキシダーゼ染色法、アビシン-ビオチン (ABC) 法又は免疫蛍光法を用いて行なうことができる〔例えば、シオッカ (Ciocca) ほか、*Meth. Enzymol.*, 121: 562~79 (1986); ヘリストロム (Hellstrom) ほか、*Cancer Research*, 46: 3917~23

(1986); 及びキムボール (Kimball) (編)、「免疫学入門 (Introduction To Immunology)」(2版)、pp 113~117、マクミラン・パブリッシング (Macmillan Publ. Co. (1986) 参照)〕。例えば、免疫ペルオキシダーゼ染色法が、実施例Ⅲ中に記載されるように、肺、胸部、結腸及び卵巣癌並びに黑色腫及び肉腫との L 45 抗体の反応性、並びに正常ヒト組織試料との抗体の反応性の欠如を示すために使用された。

血清学的診断法は癌を患っていると思われる患者の血清又は他の生物学的流体中へ分泌又は「流出」された腫瘍関連抗原の検出及び定量を含む。そのような抗原は、「流出」抗原と反応性の抗体を液体試料中の抗原の存在の検出に用いる該技術において知られた方法例えば放射免疫検定 (RIA) 又は抗素結合抗体免疫吸着検定 (ELISA) を用いて液体中で検出できる〔例えば、ウオチラ (Uotila) ほか、*J. Immunol. Method*, 42: 11 (1981) 及びアルム (Alum) ほか、前掲、p. 48~51、参照〕。従って、こゝに開示した L 45 抗体を用いるこれらの検定は L 45 抗体が反応する L 45 抗原の生物学的流体中の検出、例えばヒト患者中の種々の癌及び黑色腫の検出に使用できる。従って、前記から本発明の L 45 抗体を、抗原-抗体反応を含む多くの検定に使用できることが明らかである。これらの検定には標準 RIA 法、液体及び固相の両方、並びに ELISA 検定操作、免疫蛍光法、及び他の免疫細胞化学検定が含まれ、しかしそれらに限らず (例えば、シコラ (Sikora) ほか (編)、「モノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies)」、pp 32~55、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ (Blackwell Scientific Publications)、(1984) 参照)。

本発明の L 45 抗体はまたヒト腫瘍の検出に対する生体内診断

適用に有用である。そのような方法の一つは検出可能シグナルを生ずる適当なイメージング試薬で標識した抗体を用いる腫瘍イメージング法による生体内腫瘍の検出を含む。イメージング試薬及びそのような試薬で抗体を標識する操作はよく知られている〔例えば、ベンゼルほか (Wenzel and Meares)、「放射免疫イメージング及び放射免疫療法 (Radio Immunoimaging and Radioimmunotherapy)」、エセビール (Elsevier, New York) (1983); コルチャー (Colcher) ほか、*Meth. Enzymol.*, 121: 802~16 (1986)、参照〕。標識した抗体は放射性核スキャンのような方法により検出できる〔例えば、ブラドウェル (Bradwell) ほか、「癌検出及び治療のためのモノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy)」、ボルドウイン (Baldwin) ほか (編)、pp. 65~85、アカデミック・プレス (Academic Press)、(1985) 参照〕。

本発明の L 45 抗体は多くの生体内治療適用を有する。腫瘍細胞の標的的に単独で使用されることに加えて、該抗体を適当な治療物質とともにヒト癌の治療に使用できる。例えば、治療物質を癌の部位に供給するために該抗体を治療薬又は毒素に接合又は連結することができる。そのような治療物質を抗体に接合する方法はよく知られている〔例えば、アーノル (Arnon) ほか、「モノクローナル抗体及び癌療法 (Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)」、ライズフェルド (Reisfeld) ほか (編)、pp. 243~56、アラン・アール・リス (Alan R. Liss, Inc.)、(1985); ヘリストロム (Hellstrom) ほか、「制御薬物供給 (Controlled Drug Delivery)」(2版)、ロビンソン (Robinson) ほか (編)、pp. 623~53、マーセル・デッカー (Marcel Dekker, Inc.)、(1987); トルペ (Thorpe)、「モノクローナル抗体」、'84

: 生物学的及び臨床的適用 (Monoclonal Antibodies '84 : Biological And Clinical Applications)」、ピンチエラ (Pinchera) ほか (編)、pp 475~506 (1985); 及びトルペ (Torpe) ほか、*Immunol. Rev.*, 62: 119~58 (1982) 参照〕。L 45 抗体は細胞を試験管内でそれにさらすときに容易に内在化されないので、例えば組換えDNA法を用いて抗体を酵素と結合させることにより化学療法薬を腫瘍細胞に標的させることができましいであろう。そのような複合体が腫瘍に局在化されると酵素は投与される不活性 (非毒性) ブロドラッグを接合体が腫瘍細胞に結合した後活性抗癌薬に転化できる〔例えば、センター (Senter) ほか、*Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)*, 85: 4842~46 (1988)、参照〕。

あるいは、抗体を高エネルギー放射線例えば ^{111}I のような放射性同位体に結合させることができ、それは腫瘍部位に局在化されると若干の細胞死のキリング (Killing) を生ずる〔例えば、オーダー (Order)、「癌検出及び治療のためのモノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)」、ボルドウイン (Baldwin) ほか (編)、pp. 303~16、アカデミック・プレス (Academic Press)、(1985) 参照〕。なお他の慈様によれば、米国特許第4,876,880号中にセガル (Segal) により記載されたように、L 45 を第2抗体に接合させて腫瘍細胞の治療のための抗体ヘテロ接合体を形成させることができる。

本発明の L 45 抗体に対するなお他の治療適用には抗体の存在下あるいは抗体-薬物又は抗体-酵素接合体の部分として癌患者の骨髄から腫瘍細胞を除去するためにそれを使用することが含まれる。この方法によれば、自己骨髄を抗体で処理し、骨髄を患者に注入して戻すことにより半ビボで清浄にすることができる〔例

特表平4-503307(ア)

えば、ラムゼイ(Ramsey)ほか、J. Clin. Immunol., 8(2): 81~88(1988)、参照)。

さらに、前に記載した本発明のキメラ又は他の組換えL45抗体を治療的に使用できる。例えば、抗腫瘍活性を有する第2タンパク質例えはリンホカイン又はオニコスタチンの少くとも機能的に活性な部分に連結したL45抗体の少くとも抗原結合領域を含む融合タンパク質をヒト腫瘍の生体内治療に使用できる。さらに、L45の抗原結合領域がヒトP。領域例えはIgG1に連結されるキメラL45抗体を抗体依存細胞毒又は補体介在細胞毒性の促進に使用できる。さらに、該技術において知られた組換え法を、抗体の結合特異性の1つがL45の結合特異性である二重特異性抗体の構築に使用できる(例えは、米国特許第4,474,893号参照)。最後に、L45抗体の抗イディオタイプ抗体を活性腫瘍免疫処置及び腫瘍療法において治療的に使用できる(例えは、ヘルストロム(Hellstrom)ほか、「診断及び療法における共有結合修飾抗原及び抗体(Covalently Modified Antigens And Antibodies In Diagnosis And Therapy)」、前掲中、pp 35~41の「腫瘍療法モノクローナル抗体、腫瘍ワクチン、及び抗イディオタイプに対する免疫学的研究」参照)。

従って、本発明がヒト腫瘍の治療のための薬学的組成物、組合わせ、及び方法を包含することが明らかである。例えは、本発明はL45抗体の薬学的に有効な量及び薬学的に許容できる担体を含むヒト腫瘍の治療に用いる薬学的組成物を包含する。組成物はL45抗体を非修飾、治療薬(例えは薬物、毒素、酵素又は第2抗体)に接合して、又は組換形態(例えはキメラ又は二重特異性L45)で含むことができる。組成物はさらに癌の治療のための他の抗体又は接合体を含むことができる(例えは抗体カクテル)。

により精製できる。mRNAは、例えはL45抗体で免疫沈降法により分離され、cDNAが適当な発現ベクター中にクローニングされる。あるいは、L45抗体又はL45抗原に対する抗血清を、発現ベクターを用いるcDNAライブラーのスクリーニングに使用できる。精製又はクローニングしたL45抗原は単独で免疫原として、又は適当な免疫学的アジュバントとともに投与できる。精製又はクローニングしたL45抗原は本発明の方法にワクチンとして使用し一定の腫瘍に対する免疫処置に使用できる。そのようなワクチンを製造する方法は該技術において知られている(例えはエスチン(Estin)ほか、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、85:1052(1988)参照)。簡単に記載すると、組換えウイルスがクローニングした腫瘍関連抗原例えはL45抗原の発現のために構築される。組換えウイルスで感染された細胞は腫瘍抗原を細胞の表面に、並びに宿主の不適合抗原及び免疫原ウイルスタンパク質を発現するであろう。これは腫瘍拒絶反応におけるキー役を演ずる細胞免疫の誘発を容易にする。適当なウイルス例えはワイエス(Wyeth)天然痘ワクチン(ニューヨーク市衛生局)のブラーク精製したウイルスから得られるワクシニアウイルスがワクシニアウイルス「7.5K」プロモーターの制御下のK45抗原のコーディング配列を含む組換えウイルスの構築に使用される。組換えウイルスは次いで癌に対する保護のためのワクチンとして静脈内に投与できる。

記載した本発明がより完全に理解されることができるために次の実施例が示される。これらの実施例が單に例示のためであり、決して本発明の範囲を限定すると解すべきでないことを理解すべきである。

実施例1

本発明の抗体組成物は静脈内、腹腔内、経口、リンパ内又は腫瘍中への直接投与を含み、しかしそれらに限定されない普通の投与方法を用いて投与できる。静脈内投与が好ましい。

本発明の抗体組成物は、液体溶液又は懸濁液、錠剤、丸剤、粉体、坐剤、ポリマー・マイクロカプセル又はマイクロ小胞、リボソーム、及び注射可能な又は注入可能な溶液を含み、しかしそれらに限定されない種々の剤形であることができる。好ましい剤形は投与の方式及び治療適用による。

抗体組成物はまた、好ましくは該技術において知られた普通の薬学的に許容できる担体及びアジュバント例えはヒト血清アルブミン、イオン交換体、アルミニ、レシチン、緩衝物質例えはリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム及び塩又は電解質例えは硫酸プロタミンを含む。

本発明の組成物に対する投与及び用法の最も有効な方法は疾患の重さ及び経過、患者の健康及び治療に対する応答、並びに治療医師の判断による。従って、組成物の投与量はと個々の患者に対しタイトレートすべきである。しかし、本発明の抗体組成物の有効量は約1~約500mg/m²の範囲にあることができる。

抗原L45として示される本発明の新規抗原もまた治療適用に使用できる。抗原は腫瘍から精製でき、又は組換えDNA技術により製造できる(1986年2月7日に提出されたブラウン(Brown)ほかの同時係属米国特許出願第827,313号、代理人整理番号No. 5624-008、参照)。L45抗原をコードする遺伝子は最初にL45抗原のmRNAを高める方法によりクローニングできる。そのような方法の1つにより、ポリソーム(mRNAリボソーム及び新生ポリペプチド鍵からなる)を、新生鎖上のL45抗原決定基を認識する抗体でイムノアフィニティーコロマトグラフィー

L45モノクローナル抗体の調製

本発明のL45モノクローナル抗体をイー(Yeh)ほか、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、(1979)、前掲)により前に記載されたハイブリドーマ融合法を用いて製造した。簡単に記載すると、3月令BALB/cマウスを、CH3と称されるヒト肺癌からの外植培養細胞を免疫原として用いて免疫処置した。マウスは腹腔内(i.p.)5注射、各免疫処置に対し約10⁷細胞、を受けた。最後の免疫処置の3日後、脾臓を回収し、脾細胞を培地中に懸濁させた。次いでポリエチレンギリコール(PEG)を用いて脾細胞をゲンチシンでトランスフェクションしたNS1マウス骨髓細胞と融合させ(コラーほか(Kohler and Milstein)、前掲)、細胞懸濁物を、イー(Yeh)ほか、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、前掲)により記載されたように、マイクロタイヤー・ウェル中で、選択HAT培地中で増殖させた。混合物をシードし、单一融合細胞又はクローニング由来する低密度培養を形成させた。

次いでこれらのハイブリドーマ培養の上澄みを肺癌細胞系CH3上の直接結合活性について、及びドライヤード(Douillard)ほか、Meth. Enzymol., 82:168~74(1983)により記載されたものに類似するELISA検定を用いてヒト線維芽細胞の短期培養に対してスクリーニングした。この検定によれば、抗原(スクリーニングされる抗体が反応性である)をマイクロタイヤー・プレート上に固定化し、次いでハイブリドーマ上澄みとともにインキュベートする。上澄みが所望の抗体を含むならば、抗体が固定化した抗原に結合し、抗免疫グロブリン抗体-酵素接合体及び光学濃度の測定可能な変化を生ずる酵素に対する基質の添加により検出される。

この実施例のために、肺癌細胞又は対照線維芽細胞あるいは末

特表平4-503307(8)

精血白血球(PBL)を96ウエル組織培養プレート[コスター(Costar, Cambridge, MA)]中へ分配し、温り37℃インキュベーター(5%CO₂)中で一夜インキュベートした。次いで細胞を新調製1.0%グルタルアルデヒド100μlで0.5%の最終ウエル濃度に固定し、室温で15分間インキュベートし、次いで1×PBSで3回洗浄した。次に細胞をPBS中の5%BSAで30分間ブロックし、再びPBSで3回洗浄した。次いでハイブリドーマ培養の上澄みを100μl/ウエルに加え、ウエルを室温で1時間インキュベートし、細胞を3回PBSで洗浄した。次に0.1%BSA及びPBS中に希釈したヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ[ザイムド(Zymed, CA)]を100μl/ウエルの濃度に加えた。反応混合物を室温で1時間又は37℃で30分間インキュベートし、次に細胞をPBSで3回洗浄した。次いで0-フェニレンジアミン(OPD)を100μl/ウエルに加え、プレートを暗所で、室温で5~45分間インキュベートした。細胞に対する抗体結合は10~20分内に生じたウエル中の色の変化により検出された。反応を100μl/ウエルH₂SO₄の添加により停止させ、ダイナテク(Dynatech, Alexandria, VA)マイクロエライサ・オートリーダー中で、492nmで吸光度を読みとった。

免疫処置細胞系に対してなお陽性でPBLに陰性のウエルを免疫処置細胞系ペレット並びに正常な腎臓、肝臓及び脾臓組織に対して免疫組織学技術により試験した。

この検定は完全細胞又は精製した溶性抗原あるいは細胞抽出物を固定化抗原として用いて行なうことができるることを認めるべきである。溶性抗原又は細胞抽出物を抗原として用いたとき、抗原は初めてPBS中で50μl/ウエルに塗布し、プレートを検定の開始前に室温で一夜インキュベートした。完全細胞を抗原とし

て用いるとき、それを新鮮で又は固定化後に使用できる。どの場合にも、細胞を初めに培地中で100μl/ウエルで10⁴細胞に塗布し、37℃のインキュベーター(5%CO₂)中で一夜インキュベートした。

肺癌細胞系に結合し、正常組織に結合しない抗体を生じたハイブリドーマをこのように試験管内で選択し、クローン化し、広げ、さらに抗体特異性について試験した。ヒト肺癌と反応性の抗体を生じたハイブリドーマを再びクローン化し、広げ、プリスタン感作3月令BALB/cマウス中へ注射し、そこでそれらを腹水腫瘍として増殖させた。

この操作後、ハイブリドーマ細胞系L45が得られ、クローン化し、マウス中へ注射し、腹水腫瘍として発生させた。前に開示したように、該L45ハイブリドーマはATCCに寄託された。腹水中に分泌された抗体はプロテインA-セファロース[例えばエイ(By)ほか、Immunochimistry, 15: 429~438(1978)参照]で、又はセファクリルS-300上のゲル通過により精製した。精製したL45抗体を以後のキャラクタリゼーションに用いた。

実施例II

L45モノクローナル抗体のキャラクタリゼーション

イソタイプ決定

L45ハイブリドーマにより生成された免疫グロブリンのクラスの決定に、次の方法を用いた。

a) オクタロニー免疫拡散法

L45ハイブリドーマ細胞の上澄みの分割量を25%寒天平板の中心ウエル中に置いた。単一特異性ウサギ抗マウスIgイソタイプ抗体[サザン・バイオテクノロジー(Southern

Biotechnology, Birmingham, AL)]を外側ウエル中に置き、37℃で24~48時間インキュベートした。次いで沈殿線を読んだ。
b) ELISAイソタイピング

ダイナテク(Dynatech)のイムロン(Immuron)96ウエルプレートをヤギ抗マウスIg抗体で1μg/ml濃度に、PBS中50μl/ウエルコートし、4℃で一夜カバーして置いた。プレートをPBS/ツィーン20、0.05%で洗浄し、培地100μl/ウエルで、室温で1時間ブロックした。プレートを洗浄した後L45ハイブリドーマの上澄みを加え、室温で1時間インキュベートした。ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSで洗浄した後プレートをベルオキシダーゼに接合した単一特異性ウサギ抗マウスIgイソタイプ抗体[ザイムド(Zymed)]とともに37℃で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートを0.1Mクエン酸塩緩衝液、pH4.5、中の1mg/ml 0-フェニレンジアミン及び0.03%H₂O₂とともにインキュベートした。630nmにおける光学濃度をダイナテク(Dynatec)ELISAプレートリーダーで測定した。

これらの操作に基づいてL45モノクローナル抗体がIgG2aイソタイプであることが決定された。

L45モノクローナル抗体の結合特性

抗原の細胞下局在を、非イオン性界面活性剤による透通性化の前後の細胞に対する抗体結合の測定により決定した。完全な培養細胞の細胞表面に対する抗体結合は、ヘルストロム(Hellstrom)ほか、Cancer Research, 46: 3817~3923(1986)により記載されたように、蛍光標示式細胞分取器(FACS)Ⅱを用いる直接蛍光により確認した。簡単に記載すると、FACS細胞分取器を用いる結合分析のために、1×10⁴培養細胞を

IMDM培地[キブコ(Gibco, Grand Island, NY)]中の1.5%ウシ胎児血清(FBS)中で500μl/管の全体積に分取した。細胞をセロフュージ(Serofuge)で1.5分間遠心分離し、上澄みを除去した。10μg/mlのL45モノクローナル抗体100μlを各管に加え、次いでその内容物を混合し、水上で30分間インキュベートした。反応混合物をセロフュージ上で1.5分間の遠心分離により15%FBS/IMDM500μlで3回洗浄した(管は第3洗浄後プロットした)。次いで15%FBS/IMDM中に1:25に希釈した最適化FITC接合ヤギ抗マウスIgG抗体[タゴ(Tago, Burlingame, CA)]50μlを各管に加え、反応混合物を混合し、30分間インキュベートした。次いで洗浄段階を繰返し、管のプロッティング後各ペレットをPBS200~500μl中に再懸濁した。各試料をクールター・エピックス(Coulter Epics)C-FACSで試験し平均蛍光強度(MFI)を測定した。MFIから線蛍光当量(LPE)を改良した。陰性対照のLFEにより割算した各試験試料のLFEは特異抗体対照抗体の染色された細胞の明るさの比を与えた(1.0=螢光に差なし、2.0=螢光が明るさとして2倍など)。結合データは表1中に示される。

特表平4-503307(9)

表 1

種々の細胞系に対するL45抗体の結合

細胞系	L45抗体結合比
2981肺癌	15.6
CH3肺癌	3.3
2707肺癌	1.0
HCT116肺癌	7.4
3477乳癌	13.5
RCA結腸癌	21.0
3347乳癌	1.6
C結腸癌	24.3
CEM Tリンパ球	1.0
MOLT4Tリンパ球	1.3
P34R-1 Bリンパ腫	1.0
末梢血細胞	1.0

表1が示すように、L45モノクローナル抗体が肺、胸部及び結腸癌細胞系と反応したが、しかしT又はBリンパ腫系とも、また正常末梢血白血球とも反応しなかった。

免疫組織学

Immunohistochemistry, pp. 104~69, ジョン・ワiley・アンド・サンズ (John Wiley & Sons, New York) (1979) 中に記載され、ガリグース (Garrigues) ほか、Int. J. Cancer, 29: 511~15 (1982) により改変されたスターンバーガー (L. A. Sternberger) のPAP法を凍結組織切片上の免疫組織学的研究に用いた。これらの試験のための標的組織は外科で得られ、液体窒素中で予冷したイソペンタンを用いて除去4時間内に凍結した。次いで組織を液体窒素中に又は-70°Cで、使用するまで

貯蔵した。凍結切片を調製し、風乾し、アセトンで処理し、再び乾燥した [ガリグース (Garrigues)、前掲、参照]。組織学的評価に用いる切片はヘマトキシリジンで染色した。非特異的バックグラウンドを減らすため、切片をPBS中に1/5に希釈した正常ヒト血清とともにブレインキュベートした [ガリグース (Garrigues) ほか、前掲、参照]。マウス抗体、ウサギ抗マウス IgG、及びマウスPAPを10%正常ヒト血清及び3%ウサギ血清の溶液中に希釈した。ウサギ抗マウスIgG [スターンバーガー・マイヤー・イムノケミカルズ (Sternberger-Meyer Immunochemicals, Inc., Jarettsville, MD)] は1/50の希釈で用いた。特に精製したPAP 2 mg/mlを含むマウスペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ複合体 [PAP、スターンバーガー・マイヤー・イムノケミカルズ (Sternberger-Meyer Immunochemicals, Inc.)] は1/80の希釈で用いた。

染色操作は一連の切片を特異抗体、すなわちL45、又は対照抗体で2.5時間処理し、切片を室温で、1/50に希釈したウサギ抗マウスIgGとともに30分間インキュベートし、次いで切片を1/80希釈マウスPAP複合体に室温で30分間さらすことから構成された。抗体による各処理後にスライドをPBS中で2回洗浄した。

免疫組織化学的反応は、新たに調製した0.05Mトリス緩衝液、pH7.6中の0.5%3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 [シグマ・ケミカル (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)] 及び0.01%H₂O₂を加えることにより5分間顯色させた [ヘルストロム (Hellstrom) ほか、J. Immunol., 127: 57~60 (1981)、参照]。さらに蒸留水中の1%OsO₄溶液に20分間さらして染色を強めた。切片を水で洗浄し、アルコール中で脱水し、キレ

ン中で清浄にし、スライド上に載せた。並行切片はヘマトキシリジンで染色した。

スライドはそれぞれコード下に評価し、コードした試料は別の研究者によりチェックした。典型的なスライドは微分干渉コントラスト光学素子 [ファイスーノマルスキ (Zeiss-Nomarski)] の使用により撮影した。抗体染色の程度は0 (反応性なし)、+ (若干の弱い陽性細胞)、++ (細胞の少くとも1/3が陽性)、+++ (大部分の細胞が陽性)、++++ (すべての細胞が強く陽性)として評価した。+及び0染色の間の差は+及び++染色の間より明瞭でないカットであったので、++又はそれ以上として類別された染色を「陽性」と考えた。新生物及び基質細胞の両方が腫瘍試料中に認められた。記録された染色は、基質細胞が全く染色されないか又は腫瘍細胞より非常に弱く染色されたので、腫瘍細胞の染色である。

表2は種々の腫瘍及び正常組織試料のL45モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色を与える。その表が明らかに示すように、L45抗体は広範囲のヒト腫瘍試料と反応し、試験した多くの正常ヒト組織と反応性がないことを示す。

表 2
L45モノクローナル抗体による腫瘍及び正常組織試料の免疫ペルオキシダーゼ染色

組織型	抗体結合 (陽性腫瘍の数/試験腫瘍全数)
結腸癌	13/13
肺癌	10/13
乳癌	15/15
卵巣癌	5/6
黒色腫	8/8
肉腫	4/6
正常組織: 肺	0/3
腎	0/4
肝	0/4
心	0/1
卵巣	0/1
副腎	0/1
睪丸	0/1
胸部	0/8
脛	0/1
皮膚	0/5
肺	0/5
結腸	0/6
脳	0/2
甲状腺	0/3
リンパ腫	0/2

実施例Ⅲ

特表平4-503307(10)

L 4 5 抗体により認識された L 4 5 抗原

精製

L 4 5 抗体と反応性の抗原を確認するために、L 4 5 抗原を A 5 4 9 細胞 (ATCC, Rockville, MD) から分離し、イムノアフィニティーコロマトグラフィーにより精製した。L 4 5 抗原は、0.15M-NaCl 及び 1 mM フェニルメターンスルホニルフルオリドを含む 10 mM Tris-HCl 缓衝液、pH 8.5、中の 0.5% NP 40 で A 5 4 9 細胞膜から可溶化し、イムノアフィニティーコロマトグラフィーにより精製した。カラムは L 4 5 抗体をカルボニルジイミダゾール活性化アガロース (Reacti-Gel) (6 X)、ピアス (Pierce, Rockford, IL) に結合させることにより作製した。結合した L 4 5 抗原をアフィニティー支持体から 0.5% NP 40 及び 0.15M-NaCl を含む 0.5M グリシン-HCl 缓衝液、pH 2.3、で溶離させた。溶離した L 4 5 抗原はさらに 1.5% アクリルアミドゲル上の分離用ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリラミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により精製した。電気泳動後、ゲルをクーマーシーブリリアントブルー (10% 酢酸及び 30% イソプロパノール中 0.5 重量%) で染色し、酢酸 (5%, v:v) 及びメタノール (17%, v:v) の浴液中で脱色した。染色された L 4 5 抗原バンド (Mr 100,000) をレザーブレードで切り取り、直ちに、ハンカビラー (Run kapiller) ほか、Methods in Enzymology, 91: 227~236 (1983) により記載されたように F C U - D 4 0 エレクトロエリューター／コンセントレーター (シー・ピー・エス・サイエンティフィック (C. B. S. Scientific Co., San Diego, CA)) で電気溶離にかけた。

配列分析

プロテアン (Mini-Protean) II 電気泳動セル、バイオ・ラボ (Bio-Rad, Richmond, CA) にかけ、トウビン (Towbin) ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76: 4350~4354 (1979) により記載されたように、しかしメタノールをトランスファー緩衝液から省略してハイボンド (Hybond) -N ナイロン膜 (アマーラム (Amersham Corp., Arlington Heights, IL)) に電気泳動的に移した [ミニ・トランスプロット・エレクトリック・トランスファー・セル、バイオ・ラボ (Bio-Rad, Richmond, CA)]。L 4 5 抗原は第 2 抗体としてペルオキシダーゼ接合ヤギ抗マウス IgG [ハイクローン・ラボ (HyClone Lab., Logan, UT)] を、及び色原体として 4-クロロ-1-ナフトールを用いて免疫検出した [ホーケス (Hawkes)、Anal. Biochem., 123: 143~146 (1982)]。免疫検出は Mr = 100,000 における主バンドが L 4 5 抗体で特異的に染色されたことを示した。

B) 放射免疫沈降

A 5 4 9 細胞を、10% 透析ウシ胎児血清 (FBS) を補足した RPMI 1640 培地 (グルコース不含又はロイシン不含 RPMI 1640 セレクトアミン・キット (Select-Amine Kit)、GIBCO) 中で 37°C で 5 時間インキュベートすることにより、それぞれ [³H]-グルコサミン及び [³H]-ロイシンで標識し、10% FBS を補足した DMEM 培地中で一夜追跡した。細胞ペレットを 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.2、1.50 mM-NaCl、2 mM-EDTA、0.1% SDS、1% トリトン (Triton) X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、PMSF (10 μg/ml)、アブロテニン (10 μg/ml) で抽出した。溶解物を L 4 5 抗体とともに 4°C で 1 時間インキュベートすることにより L 4 5 抗原を免疫沈降させた。抗原抗体複合体をヤギ抗

自動エドマン (Edman) 分解を L 4 5 抗原の 2 つの調製物 : 1) 抗原 3.8 pmol 及び 2) 抗原 1.4 pmol、でバルスド液体タンパク質シーケンサ (モデル 475 A、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)) 中で行った。フェニルチオヒダントインアミノ酸導体はモデル I 20 A オンライン HPLC 装置 (アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems, Inc.)) 上の逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) オンラインにより、PTH-C18 カラム及び酢酸ナトリウム/テトラヒドロフラン/アセトニトリル勾配を溶離に用いて分析した。

L 4 5 抗原のアミノ末端アミノ配列は次のとおりである :

1 5 10 15 20 25
W-Y-T-V-N-S-A-Y-G-D-T-I-I-P-X-R-L-D-V-P-Q-N-L-M-F

(式中、X は確認されなかったアミノ酸を表わす。)

26 残基 L 4 5 アミノ末端配列を PIR データベース (PIR Release 180, 1988 年 9 月; GenBank Release 57.0, 1988 年 9 月; NEW, 1988 年 11 月 30 日; DIF, 1988 年 11 月 30 日; SWISS PROT, 1988 年 11 月 30 日; 及び LOS PRO, 1988 年 11 月 30 日) に比較すると、他の既知配列との有意な配列相同を示さなかった。

L 4 5 抗体により確認された抗原は約 100,000 ダルトンの分子量 (Mr) のタンパク質抗原である。

免疫学的キャラクタリゼーション

A) ウェスタンプロット分析

イムノアフィニティー精製 L 4 5 抗原をレムリ (Laemmli, U. K.)、Nature, 227: 680~685 (1970) により記載されたように、SDS-PAGE (7.5% アクリルアミド、ミニ

マウス IgG 及びパンソルビン (Pansorbin, スタヒコッカス・アクレウス (Staphylococcus aureus) 細胞、カルビオケム (Calbiochem, San Diego, CA)) で、各 4°C で 30 分間連続的にインキュベートすることにより沈殿させた。免疫沈降物を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.2、1.50 mM-NaCl、2 mM-EDTA、0.1% NP 40 で 4 回洗浄し、SDS-PAGE により還元及び非還元条件下に分析し、ゲルを EN³HANCE™ (ニュー・イングランド・ニュークリア (New England Nuclear, Boston, MA)) で含浸した後フルオログラフィーにより可視化した。

L 4 5 抗体は [³H]-ロイシン及び [³H]-グルコサミン標識細胞の両方ににおいて Mr = 100,000 を有する L 4 5 抗原を特異的に沈殿した。これらのデータは L 4 5 モノクローナル抗体により認識された抗原決定基が Mr = 100,000 を有する特有一重鎖タンパク質上に位置することを示す。L 4 5 抗原は肺、胸部、結腸及び卵巣癌細胞並びに黑色腫及び肉腫細胞を含む種々の腫瘍細胞に発現する。

上に示した本発明の多くの改変及び変形を、その精神及び範囲から逸脱することなく行なうことができる事が明らかである。記載した特定の態様は単に例として示され、本発明は単に請求の範囲の関係により限定される。

特表平4-503307 (11)

SEARCHED		SEARCHED AND SERIALIZED															
INVENTIONAL AREA(S) FOR WHICH THIS SEARCH WAS MADE																	
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OR SUBJECT CLASSIFICATIONS INDICATED IN PCT/US90/00407																	
IPC (5): A61K 47/00, A61K 35/00, A61K 37/00, G07K 13/14 US CL : 424/9, 435/7, 436/348, 514/2, 530/387																	
II. FILING BRANCHES																	
Chemical Abstract Services Disclosure Statement																	
Information Required under the American Classification System to the extent that such information is required in the PCT Search																	
Chemical Abstract Services On-Line, File Rioris Previous And APS. Please See Attachment For Search Terms.																	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE PRIOR ART																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Document No.</th> <th>Reference in Class No. 4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Cancer Research, Vol. 46, August 1986, Hellstrom et al. "Monoclonal Mouse Antibodies Raised against and Human Lung Carcinoma", pages 3917-3923. See Abstract, page 3917, column 1, lines 1-6, page 3920, column 3, lines 1-7 and page 3922, column 2, lines 4-24.</td> <td>1-8, 10-17 and 33-38 1-41</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Biological Abstracts, vol. 78(11), 1984, Camarquillo et al. "Diagnosis of and Therapy For solid tumors with radionuclided antibodies and immune fragments", see page 9549 Abstract no. 85085, cancer tract. Rep. 68(1) : 317-328. 1984.</td> <td>1-8, 10-17 and 33-38 1-41</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Biological Abstracts, vol. 76(10), 1982, Hellstrom et al. "Tumor - associated antigen p97 continues to be expressed after prolonged exposure of cells to monoclonal antibody", see pages 8125 Abstract no. 73937 Int. J. Cancer, 31(5) : 533-536. 1982.</td> <td>1-8, 10-17 and 33-38 1-41</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Chemical Abstracts, vol. 106, 1987, Hellstrom et al. "Manufacture of monoclonal antibodies to human non-small cell lung carcinomas", see page 559 Abstract no. 136874c, Eur. Pat. App. EP 203,352 (Cl.008 13/00), 03-06-1987-1988.</td> <td>1-8, 10-17 and 33-38 1-41</td> </tr> </tbody> </table>				Document No.	Reference in Class No. 4	<input checked="" type="checkbox"/>	Cancer Research, Vol. 46, August 1986, Hellstrom et al. "Monoclonal Mouse Antibodies Raised against and Human Lung Carcinoma", pages 3917-3923. See Abstract, page 3917, column 1, lines 1-6, page 3920, column 3, lines 1-7 and page 3922, column 2, lines 4-24.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41	<input checked="" type="checkbox"/>	Biological Abstracts, vol. 78(11), 1984, Camarquillo et al. "Diagnosis of and Therapy For solid tumors with radionuclided antibodies and immune fragments", see page 9549 Abstract no. 85085, cancer tract. Rep. 68(1) : 317-328. 1984.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41	<input checked="" type="checkbox"/>	Biological Abstracts, vol. 76(10), 1982, Hellstrom et al. "Tumor - associated antigen p97 continues to be expressed after prolonged exposure of cells to monoclonal antibody", see pages 8125 Abstract no. 73937 Int. J. Cancer, 31(5) : 533-536. 1982.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41	<input checked="" type="checkbox"/>	Chemical Abstracts, vol. 106, 1987, Hellstrom et al. "Manufacture of monoclonal antibodies to human non-small cell lung carcinomas", see page 559 Abstract no. 136874c, Eur. Pat. App. EP 203,352 (Cl.008 13/00), 03-06-1987-1988.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41
	Document No.	Reference in Class No. 4															
<input checked="" type="checkbox"/>	Cancer Research, Vol. 46, August 1986, Hellstrom et al. "Monoclonal Mouse Antibodies Raised against and Human Lung Carcinoma", pages 3917-3923. See Abstract, page 3917, column 1, lines 1-6, page 3920, column 3, lines 1-7 and page 3922, column 2, lines 4-24.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41															
<input checked="" type="checkbox"/>	Biological Abstracts, vol. 78(11), 1984, Camarquillo et al. "Diagnosis of and Therapy For solid tumors with radionuclided antibodies and immune fragments", see page 9549 Abstract no. 85085, cancer tract. Rep. 68(1) : 317-328. 1984.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41															
<input checked="" type="checkbox"/>	Biological Abstracts, vol. 76(10), 1982, Hellstrom et al. "Tumor - associated antigen p97 continues to be expressed after prolonged exposure of cells to monoclonal antibody", see pages 8125 Abstract no. 73937 Int. J. Cancer, 31(5) : 533-536. 1982.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41															
<input checked="" type="checkbox"/>	Chemical Abstracts, vol. 106, 1987, Hellstrom et al. "Manufacture of monoclonal antibodies to human non-small cell lung carcinomas", see page 559 Abstract no. 136874c, Eur. Pat. App. EP 203,352 (Cl.008 13/00), 03-06-1987-1988.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41															
<small>* Special attention is given to prior art which may be relevant to the present invention. ** Information furnished after the examination date, and/or which may not be included with the classification and search report, is furnished at the request of the Inventor. *** Other documents not published or not yet published. **** Not relevant to the present invention. ***** Document member of the same patent family.</small>																	
IV. CERTIFICATIONS																	
Date of the Action Component of the International Search	Date of Issue of the International Search Report	06 JUL 1990															
14 MAY 1990	SEARCHED	<i>Florida B. Hoffer</i>															
SEARCHED	SERIALIZED	FLA/BS															

PCT/US90/00407

ADDITIONAL INFORMATION CONTAINED FROM THE EXAMINER SHEET

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNPATENTABLE

This international search report has not been conducted in respect of certain claims under Article 17(3) as far as the following concerns:

Class numbers _____ because they relate to subject matter not required to be examined by this Authority, namely _____

Class numbers _____ because they relate to parts of the international application as far as they with the present application as such or as it stands prior to the filing of this international search report can be carried out as follows:

Otherwise _____

PCT Rule 16.1

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKED

The International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:

PLEASE SEE ATTACHMENT

1. An additional additional claim was filed directly by the applicant, this additional search report shows of inventable subject matter which is not relevant to the present invention. **Differentiation.**

2. An only some of the recorded additional claims have been made clear to the applicant, the International Searching Authority will issue another of the examination documents for which have been such adequately claimed.

3. The reported additional search has been made clear to the applicant. Consequently, the International search report is directed to the claims and invention in the claims it is directed to other inventions.

4. An additional additional claim was filed directly by the applicant. Consequently, the International search report is directed to the claims and invention in the claims it is directed to other inventions.

Reasons for Prior:

The additional search has been incorporated by reference in the present application.

The present application has paid the payment of additional search fees.

Group IV is directed to a separate and distinct process for using the product of Group I, Group V is directed to a separate and distinct product and Group VI is direct to a separate and distinct product and a process of using that product.

The search burden involved for each additional invention is undue, not only insofar as the additional parent search indicated by the separate classifications, but also insofar as considerable additional literature searches covering the entire classes noted above.

REASONS FOR HOLDING LACK OF UNITY OF INVENTION:

Group I is directed to a product and a method for using that product,
Group II is directed to a separate and distinct product,
Group III is directed to a separate and distinct process for using the product of Group I,

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE PERTINENT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		Relevant to Claims
Copies:	Chemical Abstracts, vol. 108, 1987, Hellstrom et al., "Preparation of a hybridoma producing anti-human non-small cell lung carcinoma monoclonal antibodies, purification of said antibodies, and partial characterization of the corresponding antigen", US Appl. 53,172, 26 February 1986.	1-8, 10-17 and 33-38 1-41
Q	US A, 4,731,379 (Hellstrom et al) 12 April 1988 (See abstract, column 2, lines 59-68, column 3, lines 1-7, column 4, lines 1-20, column 5, lines 6-43).	1-29 and 33- 38 1-9, 15-20, 25-28, 30-32, 35, 36 and 39- 41
Q	US A, 4,779,627 (Sakamoto et al) 01 April 1986 (See Abstract, column 3, lines 62-68, column 4, lines 1-7, Table 2).	1-18 and 33- 38 1-37 and 39-41
A	US A, 4,713,352 (Bender et al) 15 December 1987 (See Abstract).	1-41
A	US A, 4,753,894 (Prunkel et al) 28 June 1988 (See Abstract).	1-41

ATTACHMENT TO FORM PCT/ISA/210 - PART II.

II. FIELDS SEARCHED/SEARCH TERMS:

CMB
Bisacis
APBINVENTOR SEARCH
Monoclonal antibody
Lung
Colon
Breast
Ovarian
Tumor or Cancer or Cancer? or
carcinoma or Malignant
100kDa
100 kilodal ton
100,000

第1頁の続き

⑤Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号
A 61 K 49/00	A	8415-4C
49/02	A	8415-4C
C 07 K 15/14		7731-4H
C 12 N 5/20		
5/28		
G 01 N 33/53	D	8310-2J
33/574	B	9015-2J
33/577	B	9015-2J
// C 12 N 15/06		
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

- ②発明者 ヘルストロム イングガルド アメリカ合衆国 ワシントン州 98105 シアトル ノースイースト サーバー ドライヴ 3925
- ②発明者 マルカルト ハンス アメリカ合衆国 ワシントン州 98040 マーサー アイランド サウスイースト フォーティシックスストリート 9222
- ②発明者 ヨネヤマ ヨシタカ アメリカ合衆国 ワシントン州 98005 ベルヴィュー ナンバー エフ304 ノースイースト テンス ブレイス 12760